

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720081152526

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

几丁质酶缺失型重组杆状病毒载体的构建及肠道病毒 EV71 类病毒颗粒的表达与纯化

Construction of a ChiA⁻-deleted baculovirus vector and
Expression and purification of the EV71 VLP

王永梅

指导教师姓名: 张 军 教 授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

| | |
|---------------------------|------|
| 摘要..... | VI |
| Abstract..... | VIII |
| 缩略词..... | X |
| 第一章 前言..... | 1 |
| 1 昆虫杆状病毒表达系统..... | 1 |
| 1.1 杆状病毒的分子生物学..... | 1 |
| 1.2 昆虫杆状病毒表达系统..... | 11 |
| 2 Red 重组技术..... | 16 |
| 2.1 Red 重组系统简介..... | 16 |
| 2.2 Red 同源重组机制..... | 16 |
| 2.3 Red 重组策略..... | 18 |
| 2.4 Red 重组技术的应用..... | 19 |
| 3 肠道病毒 EV71 型研究进展..... | 20 |
| 3.1 手足口病概述..... | 20 |
| 3.2 EV71 的分类和结构..... | 21 |
| 3.3 EV71 的基因结构及其编码蛋白..... | 22 |
| 3.4 EV71 病毒的感染与复制周期..... | 23 |
| 3.5 EV71 的流行病学..... | 24 |
| 3.6 EV71 的诊断与抗病毒治疗..... | 28 |
| 3.7 EV71 疫苗研究进展..... | 30 |
| 4 本论文研究的思路、目的和方法..... | 33 |
| 第二章 材料和方法..... | 35 |
| 一 材料..... | 35 |
| 1 主要仪器..... | 35 |
| 2 主要试剂和材料..... | 36 |
| 3 常用溶液及培养基配制..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 二 方法 | 41 |
| 1 基因克隆的构建 | 41 |
| 2 昆虫细胞培养和重组杆状病毒的生产 | 45 |
| 3 重组蛋白质的在 E.coli 中的表达 | 45 |
| 4 重组蛋白的纯化方法 | 46 |
| 5 蛋白活性检测 | 47 |
| 6 VLP 的透射电镜观察 | 47 |
| 7 兔多抗的制备 | 47 |
| 8 计算机辅助设计与分析 | 48 |
| 第三章 结果与分析 | 49 |
| 3.1 AcBacmid 几丁质酶基因的敲除 | 49 |
| 3.1.1 重组系统的选择 | 49 |
| 3.1.2 AcBacmid 几丁质酶基因敲除策略 | 50 |
| 3.1.3 DH10Bac(pKD46)菌株的构建 | 52 |
| 3.1.4 线性片段 ChiAup-Cm-ChiAdown 的构建 | 53 |
| 3.1.5 含有 λ 噬菌体 Red 重组酶的 DH10Bac 感受态细胞的制备 | 54 |
| 3.1.6 线性 DNA 的同源重组 | 55 |
| 3.1.7 重组子的鉴定 | 55 |
| 3.1.8 本章小结 | 61 |
| 3.2 肠道病毒 71 型类病毒颗粒的表达纯化 | 62 |
| 3.1.1 重组杆状病毒 rBV-P1-3CD(ChiA ⁻)的构建与生产 | 62 |
| 3.1.2 重组杆状病毒 rBV-3CD-P1 (ChiA ⁻) 在不同昆虫细胞株中的表达 | 65 |
| 3.1.3 rBV-3CD-P1 (ChiA ⁻) 在 sf21 中表达条件的优化 | 67 |
| 3.1.5 EV71 重组蛋白活性分析 | 72 |
| 3.1.6 目的蛋白的纯化 | 74 |
| 3.1.7 本节小结 | 75 |
| 讨论 | 76 |
| 1 一种适用 Bac-to-Bac 系统的进行杆状病毒基因组改造的重组系统的建立 | 76 |
| 2 EV71 类病毒颗粒在昆虫细胞中的表达 | 77 |

| | |
|--------------------------|----|
| 3 EV71 类病毒颗粒表达条件的摸索..... | 77 |
| 4 EV71 重组蛋白的活性分析..... | 78 |
| 5 EV71 类病毒颗粒的纯化..... | 78 |
| 6 EV71 类病毒颗粒疫苗的研发..... | 79 |
| 7 未来展望..... | 80 |
| 小结..... | 81 |
| 参考文献..... | 82 |
| 致谢..... | 88 |

Table of Contents

| | |
|---|------|
| Abstract in Chinese | VI |
| Abstract in English | VIII |
| Abbreviation | X |
| Chapter 1: Preface | 1 |
| 1 Insect-baculovirus expression system | 1 |
| 1.1 Molecular biology of baculovirus | 1 |
| 1.2 Insect-baculovirus expression system | 11 |
| 2 The technology of Red recombination system | 16 |
| 2.1 The overview of Red recombinant system | 16 |
| 2.2 The mechanism of Red recombination | 16 |
| 2.3 The strategy for Red recombination | 18 |
| 2.4 The applications of Red recombination | 19 |
| 3 Progress of research on the enterovirus 71 | 20 |
| 3.1 The overview of hand-foot-mouth disease | 20 |
| 3.2 The classification and structure of EV71 | 21 |
| 3.3 The genome structure of EV71 and its encoded proteins | 22 |
| 3.4 The life cycle of EV71 | 23 |
| 3.5 The epidemiology of EV71 | 24 |
| 3.6 EV71 diagnosis and antiviral treatment | 28 |
| 3.7 The progress of research on the EV71 vaccine | 30 |
| 4 The meaning and content of this research | 33 |
| Chapter 2: Materials and methods | 35 |
| 1 Materials | 35 |
| 2 Methods | 41 |
| Chapter 3: Results and analysis | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 The deletion of the ChiA gene of AcBacmid | 49 |
| 3.2 The expression and purification of EV71 VLP | 61 |
| Discussion | 75 |
| 1 The construction of a recombination system special for Bac-to-Bac baculovirus expression system | 75 |
| 2 The expression of EV71 VLP in insect cells | 76 |
| 3 The optimization of the expression condition | 76 |
| 4 The analysis of the activity of recombinant antigen | 77 |
| 5 The purification of EV71 VLP | 77 |
| 6 The research and development of EV71 VLP vaccine | 78 |
| 7 The next work | 79 |
| Brief Summary | 80 |
| Reference | 81 |
| Acknowledgement | 88 |

摘要

虽然昆虫杆状病毒表达系统已经成功表达了数千种重组蛋白,但由于各种原因目的蛋白产量很难达到较高水平,并且在系统中,分泌性蛋白和膜结合糖蛋白很难表达或表达水平很低,因而,利用基因工程方法对杆状病毒表达系统进行优化具有重要的应用价值。

蛋白降解一直以来是影响外源蛋白表达水平的主要问题,这是 BEVS 自身固有的问题。BEVS 是一个裂解性系统,在病毒感染和表达的过程中,病毒本身表达出的蛋白酶会降解目的蛋白,特别是几丁质酶和半胱氨酸蛋白酶,严重影响目的蛋白的得率。与此同时,几丁质酶是分泌性蛋白,会对外源分泌性蛋白进入分泌途径造成强大的竞争力。

本研究基于 λ 噬菌体 Red 重组系统、建立了一种适用于对杆状病毒 Bacmid 进行基因改造的重组方法。并进一步以 AcMNPV Bacmid 上的 ChiA 基因基因敲除为例阐述该重组系统的可行性。PCR 及 WB 结果证实 ChiA 基因已被成功敲除,改造后的 DH10Bac 可应用于任意外源蛋白的表达。该重组方法简单高效易操作,将为 Bac-to-Bac 系统中杆状病毒任意基因的改造提供极大的方便。

2008 年以来我国多次暴发了以 EV71 为主要病原体的手足口病疫情, EV71 引起的手足口病常并发严重的中枢神经系统损伤,造成较高的病死率和致残率,严重危害儿童身体健康和生命安全。该病传播途径复杂,目前尚无疫苗与抗病毒治疗药物。类病毒颗粒 (virus-like particle, VLP) 是由病毒衣壳蛋白组成的空壳粒子,一方面由于不具有病毒的遗传物质而消除了灭活疫苗潜在的危险性,另一方面它能高密度地展示病毒抗原表位,引发强有力的特异性体液免疫和细胞免疫,因此是一种可开发的理想疫苗形式。

本研究以大陆流行株 (GenBank:FJ600325.1) 为研究对象,首先借助 Bac-to-Bac 系统构建能同时表达 EV71 P1 (多角体启动子下) 和 3CD (p10 启动子下) 蛋白的几丁质酶缺失型重组杆状病毒,并于 Sf21 细胞中成功进行 EV71 VLP 的表达。

其次,通过对宿主细胞、感染剂量、收获时间、FBS 培养浓度等表达条件进行优化,确定以 2%FBS 浓度培养 sf21 条件下, 100ul/板病毒剂量攻毒 3 天后收

获细胞沉淀可获得较高的目的蛋白产量。

最后, 利用 36 株 EV71 特异性单抗对重组蛋白活性进行分析, 发现重组抗原与单抗的反应性很好。变性处理可能会破坏重组抗原的构象表位, 导致重组抗原与构象型单抗的反应性消失。提示本研究表达的 EV71 重组抗原存在与天然病毒类似的构象表位, 有可能能引起有效的免疫反应。进一步超速离心后透射电镜证实 VLP 的存在, 为后续研究奠定了基础。

总之, 本研究一方面构建了一种适用于杆状病毒 Bacmid 的基因改造的方法, 该方法的建立将为今后杆状病毒表达系统的优化提供便利; 另一方面利用杆状病毒表达系统成功表达了 EV71 VLP, 通过表达条件使其表达量最大化, 并进一步对其抗原性进行分析为后期 EV71 VLP 的研发奠定了基础。

关键词: EV71; 杆状病毒; Red 系统; 几丁质酶基因

Abstract

Although baculovirus expression vector system (BEVS) has been used for expressing thousands of recombinant proteins, due to various reasons, the yield of the targeted protein is difficult to reach an ideal level. In BEVS, secreted proteins and membrane proteins are hard to express. Therefore, it has important application value for using the genetic engineering methods to optimize the BEVS.

Protein degradation is one of the main problems caused by BEVS itself. BEVS is a lytic system, insect cells will release large amounts of proteases coded by baculovirus which will hydrolyze targeted protein, especially the Cathepsin (Cath) and Chitinase (ChiA). Meanwhile, ChiA is a secreted protein whose expression will bring a strong competition on the secretion of targeted protein into the secretory pathway.

We constructed a recombinant method for modifying baculovirus genes which is based on the Red recombination system. For further studying the feasibility of this method, we chose the deletion of ChiA gene on AcMNPV Bacmid as example. PCR and WB suggested that the ChiA gene had been successfully deleted which can use for the expression of targeted protein. A series of experiment indicated that the recombinant system is easy and effective enough to operate. The construction of recombinant system will provide a great convenience for the modification of baculovirus in Bac-to-Bac system.

Since 2008, Enterovirus 71(EV71) has been implicated as the etiological agent responsible for the recent outbreaks of hand-foot-mouth disease associated with severe neurological disease in China, causing high mortality and disability which do harms to children's health and safety. Due to the transmission of EV71 is very complex, there is neither EV71 vaccine nor special antiviral drug against EV71 can be available. VLP is made up of capsid proteins. On one hand, it eliminates the potential risk of inactivated vaccine due to the lacking of nucleic acid. On the other hand, it can display the viral epitopes which may induce strong humoral and cellular immunity.

Therefore, VLP is an ideal form of vaccine to develop.

In this research, we chose the EV71 mainland epidemic strain as the research objection (GenBank:FJ600325.1). Using the baculovirus expression system to express the EV71 virus-like particles (VLPs). First of all, we constructed a ChiA⁻-deleted recombinant baculovirus coexpressing EV71 P1(under polyhedrin promoter)and 3CD(under p10 promoter) proteins, successfully express the EV71 VLPs in Sf21 cells.

Secondly, by optimizing a series of expression conditions including host cell, infectious dose, harvest time and the concentration of FBS in medium, the best VLPs yield was achieved by infecting Sf21 cells cultured in 2%FBS concentration with 100 μ l/palte rBV-P1-3CD which was harvested 3pi.

Finally, a panel of 36 EV71 special Mabs had been prepared to analyze the activity of recombinant protein, we found that the antigen-antibody reaction was very well. Denatured treatment may destroy the conformational epitopes of recombinant antigen, resulting in disappearing of the reaction between antigen and conformational monoclonal antibody. It revealed that the EV71 recombinant antigen produced in our study have conformational epitopes which is similar to natural virus which may trigger an effective immune response. Further experiment of ultracentrifugation and TEM confirmed the presence of VLP, laying a basis for the follow-up study.

In summary, on one hand, in this study we constructed a recombinant method which will provide great convenience for the modification of baculovirus Bacmid in Bac-to-Bac system. One the other hand, we successfully expressed the EV71 VLP using BEVS, maximized the yield of recombinant protein through optimizing a series of expression condition, and analyzed the antigenic of recombinant antigen, which lay a basis for the follow-up study on EV71 VLP.

Keywords: EV71 VLP; baculovirus; Red recombinant system; ChiA gene

缩略词

- AcNPV: *Autographa californica* NPV, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒
- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- Bac-to-Bac: Bacterium to Baculovirus, 大肠杆菌-昆虫细胞穿梭载体系统
- Bacmid: Baculovirus plasmid, 杆状病毒质粒
- BEVS: Baculovirus expression vector system, 杆状病毒表达载体系统
- BmSNPV: *Bombyx mori* SNPV, 家蚕单衣壳型核形多角体病毒
- BV: Budded virus, 出芽型病毒
- CpGV: *Cydia pomonella* granulovirus, 苹果小蠹蛾颗粒体病毒
- Da: Dalton, 道尔顿
- ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定
- EM: Electron Microscopy, 电子显微镜
- GV: Granulovirus, 颗粒体病毒
- hrs: repeated homologous region, 同源重复区
- Kan: Kanamycin, 卡那霉素
- lacZ*: β -半乳糖苷酶
- Mab: Monoclonal antibody, 单克隆抗体
- MOI: Multiplicity of infection, 感染复数
- NPV: Nucleopolyhedrovirus, 核形多角体病毒
- Ori: Origin, 复制起始位点
- ORF: Open reading frame, 开放阅读框
- ODV: Occlusion derived virus, 包涵体来源型病毒
- PDV: Polyhedra derived virus, 多角体来源型病毒
- PFU: Plaque forming unit, 空斑形成单位
- RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction, 反转录聚合酶链式反应
- Tet: tet-racycline, 四环素
- VLP: Virus-like particle, 病毒样颗粒
- WB: Western Blotting, 蛋白印迹实验

第一章 前言

1 昆虫杆状病毒表达系统

1.1 杆状病毒的分子生物学

杆状病毒 (Baculovirus) 是一类寄生于节肢动物的杆状病原微生物^[1], 其宿主主要是鳞翅目、膜翅目和双翅目的昆虫。杆状病毒是已知昆虫病毒中的最大类群, 也是发现最早、研究最多且实用意义很大的昆虫病毒, 是目前研究的热点之一^[2]。杆状病毒载体表达系统 (Baculovirus expression vector system, BEVS) 是一个以杆状病毒为外源基因载体, 昆虫细胞和昆虫虫体为受体的表达系统, 已被公认为当代四大表达系统之一^[3, 4]。因其高表达效率及良好的翻译后修饰能力等优点而被广泛用于各种异源蛋白的表达。目前昆虫杆状病毒表达载体系统已经成为生产与研究各种原核和真核蛋白的有力而普及的工具。

1.1.1 杆状病毒及其分类

杆状病毒 (Baculovirus) 是有囊膜的 dsDNA 大型病毒, 病毒基因组 DNA 呈环形, 大小在 90-160kb, 是节肢动物特异的 DNA 病毒 (arthropoda-specific DNA virus)。目前已记述的杆状病毒除少数是从蛛形纲和甲壳纲分离外, 绝大多数都来自昆虫纲, 且主要集中在鳞翅目昆虫。目前已记录的杆状病毒达 600 余种, 包括鳞翅目, 膜翅目, 双翅目, 鞘翅目与毛翅目等 7 个目^[5]。

杆状病毒隶属杆状病毒科 (Baculoviridae)。根据 1995 年国际病毒分类委员会 (ICTV) 第 6 次报告, 杆状病毒科分为核形多角体病毒属 (Nucleopolyhedrovirus, NPV) 和颗粒体病毒属 (Granulovirus, GV)。二者的差异在于是病毒包涵体形状不同, 前者形成被称之为多角体 (polyhedrin) 的结构, 直径约 0.5~15 μ m。后者呈椭圆形颗粒体, 大小约为 (0.16~0.30 μ m) \times (0.30~0.50 μ m)。核型多角体病毒属病毒多角体内部可包裹多个杆状病毒粒子。根据囊膜内核衣壳数目多少分为多衣壳核型多角体病毒 (multicapsid nuclear polyhedrosis virus, MNPV) 和单衣壳型核形多角体病毒 (single nuclear polyhedrosis virus, SNPV), 前者代表种为苜蓿银纹夜蛾多衣壳型核型多角体病毒 (*Autographa californica* MNPV,

AcMNPV), 后者代表种为家蚕 (*Bombyx mori*) 单衣壳型核形多角体病毒 (BmSNPV)。颗粒体病毒属病毒内部一般只包裹 1-2 个成熟的杆状病毒粒子, 代表种为苹果小蠹蛾颗粒体病毒 (*Cydia pomonella* granulovirus, CpGV)。但是这种划分仅具有形态学的根据, 并不具有系统发育上的相互联系。最近, 有学者建议根据病毒宿主的不同将杆状病毒分为四个属^[6]: Lepidopteran-specific NPV(α -baculoviruses), Lepidopteran-specific GV(β -baculoviruses), hymenopteran-specific NPV(γ -baculoviruses), Dipteran-specific baculovirus (δ -baculoviruses)。随着杆状病毒分子生物学的进一步研究发现, 这种基于病毒宿主依赖性进化而进行的分类越来越可信了。Zanotto 等^[7]和 Bulach^[8]等在概括地分析了杆状病毒的多角体蛋白和 DNA 聚合酶蛋白的序列后, 将鳞翅目 NPV 划分为 Group I 和 Group II 两组。Group I 包括 AcNPV, OpNPV, BmNPV 等, Group II 包括 LdNPV, SeNPV 和 HzNPV 等。二者分类的依据在于 Group I 以 gp64 作为其出芽病毒的功能蛋白与细胞膜融合^[9], Group II 则依赖于 F 蛋白的作用。然而后续的研究发现这两个亚群的划分除了 gp64 和 F 蛋白外, 还有更复杂的机制。

1.1.2 杆状病毒的双相生活史

杆状病毒发育循环的最显著特征是具有双向复制周期, 又称双相生活史 (biphasic life cycle), 包含两个独特的时期, 进而产生两种具有不同形态、不同功能的表型病毒^[5], 一种是出芽型病毒粒子 (Budded virus, BV), 一种是包涵体来源型病毒粒子 (Occlusion derived virus, ODV) (图 1-1)。这两种表型的病毒粒子具有相同的基因组, 但产生于病毒感染周期的不同时期, 在细胞中的部位、形态结构、感染组织特异性及病毒侵入宿主细胞的方式都存在差异。BV 是病毒感染细胞的早期形成的出芽病毒。接种病毒到 0-24h, 病毒在细胞核内病毒发生基质上进行病毒 DNA 的复制和核衣壳的装配, 然后通过出芽方式获得囊膜。该囊膜上含有一种病毒编码的囊膜蛋白, 可以与细胞表面的特定受体相结合, 对病毒粒子在虫体内的传播和体外增殖体系中细胞间的传播起重要作用。BV 主要是在同一宿主体内的不同组织和细胞之间相互感染。ODV 被包埋于由多角体蛋白组成的包涵体中, 是在感染病毒 20h 后在寄主细胞核内形成的, 其病毒囊膜对昆虫中肠上皮柱状细胞的感染具有特异性, 对血体腔和其他组织的感染率很低, 可

以通过口腔感染。多角体在环境中非常稳定，能对病毒粒子起到保护作用。当多角体被昆虫幼虫吞食后，在虫体中肠的偏碱性环境中能迅速溶解并释放出病毒粒子，病毒粒子便由中肠开始感染虫体。ODV 对于杆状病毒在环境中的传播起重要作用。

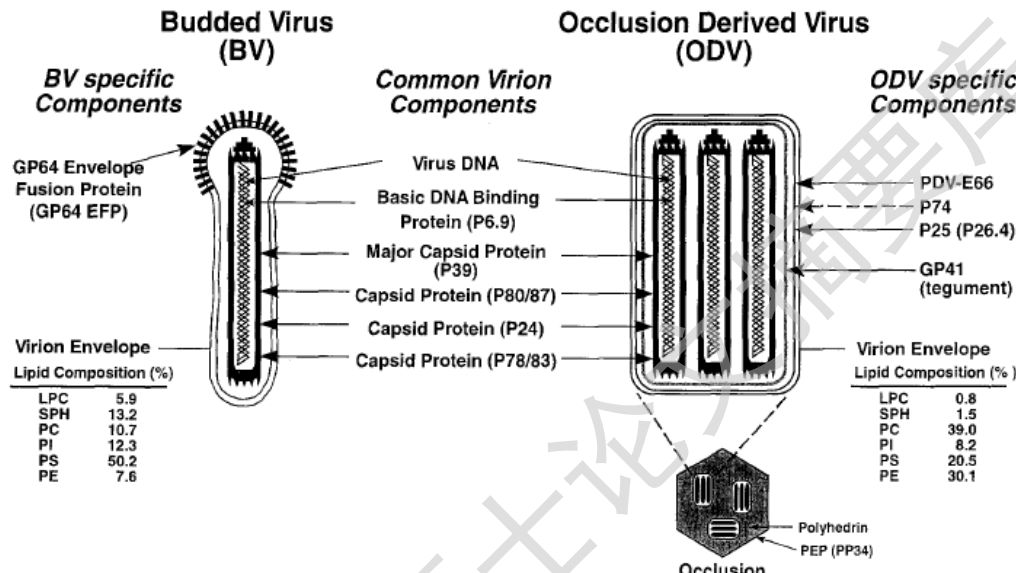


图 1-1 两种表型杆状病毒粒子的结构与组成^[10]

Fig.1-1 Structural composition of the two baculovirus virion phenotypes

1.1.3 杆状病毒的感染周期

杆状病毒除了偶尔从卵^[11]或气孔^[12]感染昆虫外，最主要的感染途径是从中肠开始的。杆状病毒感染周期分为两个阶段（图 1-2），第一阶段是 ODV 感染中肠上皮细胞，病毒复制增殖后产生出芽型子代病毒粒子（BV），从而使得它们能继续感染同一生物体内的其他类型细胞。第二阶段是 BV 侵染昆虫其他组织，此阶段的感染早期产生 BV，晚期产生 ODV，其作用是使病毒可以在恶劣的自然环境中生存，并使其他的宿主昆虫在吞食后受到感染。BV 可在组织细胞之间传递感染；ODV 则能实现虫体间的传播。

昆虫幼虫吞食附有多角体的食物后，多角体随着食物进入中肠，在呈碱性（pH8-11）的昆虫消化液的作用下溶解，病毒粒子被释放出来。研究发现，参与此过程的还有幼虫肠道中的碱性蛋白酶。病毒粒子呈游离状态后，在达到中肠上

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库